

JP 2000 309521

DIALOG(R)File 351:Derwent WPI  
(c) 2005 Thomson Derwent. All rts. reserv.

013677746

WPI Acc No: 2001-161959/\*200117\*

**New cutaneous external preparation comprising collagen and a gelatin  
collagenase degraded products is useful in antiaging treatment**

Patent Assignee: SHISEIDO CO LTD (SHIS )

Number of Countries: 001 Number of Patents: 002

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 2000309521	A	20001107	JP 200040976	A	20000218	200117 B
JP 3504205	B2	20040308	JP 200040976	A	20000218	200418

Priority Applications (No Type Date): JP 9944433 A 19990223

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan Pg	Main IPC	Filing Notes
JP 2000309521	A	12	A61K-007/48	
JP 3504205	B2	12	A61K-007/48	Previous Publ. patent JP 2000309521

Abstract (Basic): \*JP 2000309521\* A

NOVELTY - A composition comprising collagen and a gelatin  
collagenase degraded products, is new.

DETAILED DESCRIPTION - A cutaneous external preparation comprises  
effective ingredients of collagen or a collagenase degraded gelatin,  
particularly containing peptides having amino acid sequences of (I),  
with average molecular weight of 280-20,000, used for cutaneous  
antiaging agent, prevention of wrinkles, stimulation of cell growth,  
stimulation of collagen production and inhibition of collagen  
saccharification.

(Gly-X-Y)<sub>n</sub>

X, Y=an amino acid other than Gly; and

n=a positive integer.

ACTIVITY - Dermatological.

No supporting biological data given.

MECHANISM OF ACTION - None given.

USE - Antiaging, stimulation of cell growth and collagen  
production, prevention of wrinkles and inhibition of collagen  
saccharification.

ADVANTAGE - A safe antiaging agent with stimulation of cell growth  
and collagen production, prevention of wrinkles and inhibition of  
collagen saccharification.

pp; 12 DwgNo 0/0

Derwent Class: B04; D21

International Patent Class (Main): A61K-007/48

International Patent Class (Additional): A61K-007/00; A61K-038/00;  
A61K-038/17; A61P-017/16; A61P-043/00

(19)日本国特許庁 (J P)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2000-309521

(P2000-309521A)

(43)公開日 平成12年11月7日(2000.11.7)

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 7/48		A 6 1 K 7/48	
7/00		7/00	K
38/17		A 6 1 P 17/16	
38/00		43/00	1 0 7
A 6 1 P 17/16		A 6 1 K 37/12	
審査請求 未請求 請求項の数8 O L (全 12 頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願2000-40976(P2000-40976)

(22)出願日 平成12年2月18日(2000.2.18)

(31)優先権主張番号 特願平11-44433

(32)優先日 平成11年2月23日(1999.2.23)

(33)優先権主張国 日本(J P)

(71)出願人 000001959

株式会社資生堂

東京都中央区銀座7丁目5番5号

(72)発明者 鈴木 裕美子

神奈川県横浜市港北区新羽町1050番地 株

式会社資生堂第1リサーチセンター内

(72)発明者 猪股 慎二

神奈川県横浜市港北区新羽町1050番地 株

式会社資生堂第1リサーチセンター内

(74)代理人 100103160

弁理士 志村 光春

(54)【発明の名称】 皮膚外用剤

(57)【要約】

【課題】真皮に対して作用する、優れた皮膚の老化の防止作用を有し、かつ、安全性に特に優れる、抗老化作用が認められる皮膚外用剤を提供することである。

【解決手段】コラーゲン又はゼラチンのコラゲナーゼによる分解物、特に、そのアミノ酸配列が、(G l y - X - Y) n (式中、G l yは、グリシン残基を表し、X, Yは、グリシン残基を除くアミノ酸残基を表し、互いにX, Yは同一であっても、異なってもよく、nは、正の整数を表す)で表され、かつ、平均分子量が280~20000であるペプチドが含まれている、上記分解物を有効成分とする皮膚外用剤を提供することにより、上記の課題が解決されることを見出した。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 コラーゲン又はゼラチンのコラゲナーゼによる分解物を有効成分とする皮膚外用剤。

【請求項2】 コラーゲン又はゼラチンのコラゲナーゼによる分解物に、そのアミノ酸配列が、 $(Gly-X-Y)_n$ （式中、 $Gly$ は、グリシン残基を表し、 $X$ 、 $Y$ は、グリシン残基を除くアミノ酸残基を表し、互いに $X$ 、 $Y$ は同一であっても、異なってもよく、 $n$ は、正の整数を表す）で表され、かつ、平均分子量が280～20000であるペプチドが含まれている、請求項1記載の皮膚外用剤。

【請求項3】 コラーゲン又はゼラチンのコラゲナーゼによる分解物中の、 $Gly-X-Y$ （式中、 $Gly$ は、グリシン残基を表し、 $X$ 、 $Y$ は、グリシン残基を除くアミノ酸残基を表し、互いに $X$ 、 $Y$ は同一であっても、異なってもよい）で表されるトリペプチドの含量が、前記分解物中において30～100重量%である、請求項2記載の皮膚外用剤。

【請求項4】 皮膚外用剤が、抗老化用皮膚外用剤である、請求項1ないし3のいずれかの請求項記載の皮膚外用剤。

【請求項5】 皮膚外用剤が、しわ抑制用皮膚外用剤である、請求項1ないし3のいずれかの請求項記載の皮膚外用剤。

【請求項6】 皮膚外用剤が、細胞増殖促進効果が認められる皮膚外用剤である、請求項1ないし3のいずれかの請求項記載の皮膚外用剤。

【請求項7】 皮膚外用剤が、コラーゲン産生促進作用が認められる皮膚外用剤である、請求項1ないし3のいずれかの請求項記載の皮膚外用剤。

【請求項8】 皮膚外用剤が、コラーゲン糖化抑制が認められる皮膚外用剤である、請求項1ないし3のいずれかの請求項記載の皮膚外用剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、皮膚外用剤に関する技術分野の発明である。より具体的には、本発明は、皮膚における抗老化効果やしわ抑制効果、さらには、細胞増殖促進作用、コラーゲン産生促進作用、コラーゲン糖化抑制作用が認められる皮膚外用剤に関する発明である。

【0002】

【従来の技術】 人間の皮膚は、主に、外側から、表皮層及び真皮層により構成される。特に、内側を構成する真皮層は、皮膚の90%以上の体積を占め、皮膚を支える働きを担っている。そして、この真皮層の状態が、皮膚表面のはりや、表面形態に大きな影響を与えている。真皮は加齢とともに薄くなることが知られており、皮膚のしわやたるみなどの、皮膚の老化現象の要因となるのは、真皮部分が薄くなり、衰えてくることが大きく関わ

っているものと考えられている。

【0003】 このような、皮膚の老化を防ぐことを目的として、従来から、皮膚に対してペプチド類を使用して、皮膚の状態を向上させる試みが、いくつかなされている。例えば、ペプチド類の中でもオリゴペプチド類を配合した化粧品は、皮膚への密着性が良好で、しわを抑制する等の、皮膚の老化を防止することが知られている（特開昭57-2213号公報）、特に、 $Arg-Gly-Asp-Ser$ 及び $Arg-Gly-Asp$ の2種類のペプチドは、皮膚の角質層に作用して、乾燥皮膚を改善して、皮膚の老化を防止することが報告されている（特開平2-178207号公報）。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 上述したような、加齢に伴う真皮の減少は、真皮のマトリックス成分を供給している線維芽細胞の数や活性の減少による部分が多い。線維芽細胞が減少すると、マトリックス成分、特にコラーゲンが減少する。また、残りのコラーゲンも加齢とともに、糖化などの質的变化を受け、機能が低下する。それ故に、真皮部分に対する改善作用を発揮することが、しわを抑制し、肌にはりを与える等により、皮膚老化の改善を目的とする皮膚外用剤においては、非常に大切な条件である。

【0005】 しかしながら、上述したオリゴペプチドの作用は、皮膚の表面上に対するに止まっており、真皮に対しては、十分に有効な作用を及ぼすには至っていない。

【0006】 また、真皮に対して有効な作用を及ぼす試みとして、いわゆる細胞成長因子（EGF やFGF など）の、細胞増殖作用が知られているペプチド類を配合した皮膚外用剤が提供されている（特開昭61-5006号公報等）、その皮膚の老化の抑制効果は、必ずしも満足の行くものではなく、さらに、多様な生理活性を有する細胞成長因子を用いることによる、人体への影響等を、特に配慮する必要があった。

【0007】 そこで、本発明が解決すべき課題は、上述のような問題点が解決された、真皮に対して作用し、優れた皮膚の老化の防止作用を発揮し、かつ、安全性にも優れる皮膚外用剤を提供することである。

【0008】

【課題を解決するための手段】 本発明者は、この課題の解決に向けて、鋭意検討を行った。その結果、主に、コラーゲンやゼラチンのコラゲナーゼによる分解物に含まれる、特定のペプチドに、皮膚における優れた抗老化作用が認められることを見出して、本発明を完成した。

【0009】 すなわち、本発明者は、本願において、コラーゲン又はゼラチンのコラゲナーゼによる分解物〔以下、「コラゲナーゼ分解物」ともいう〕、特に、そのアミノ酸配列が、 $(Gly-X-Y)_n$ （式中、 $Gly$ はグリシン残基を表し、 $X$ 、 $Y$ は、グリシン残基を除くア

ミノ酸残基を表し、互いに同一であっても、異なってもよく、 $n$ は、正の整数を表す)で表され、かつ、平均分子量が280~20000であるペプチドが含まれているコラーゲン又はゼラチンのコラゲナーゼによる分解物を有効成分とする皮膚外用剤(以下、本発明皮膚外用剤という)を提供する。

【0010】本発明皮膚外用剤は、具体的には、①皮膚における抗老化効果(作用)〔本明細書中で「抗老化効果(作用)」と記載する場合には、この「皮膚における抗老化効果(作用)」のことを意味するものとする〕が認められる皮膚外用剤(この態様の本発明皮膚外用剤を、特に、本発明抗老化用皮膚外用剤という)、②しわ抑制効果、すなわち、肌上のしわの発生を予防し、しわを抑制し得る効果が認められる皮膚外用剤(この態様の本発明皮膚外用剤を、特に、本発明しわ抑制用皮膚外用剤という)、③細胞増殖促進作用が認められる皮膚外用剤(この態様の本発明皮膚外用剤を、特に、本発明細胞増殖促進皮膚外用剤という)、④コラーゲン産生促進作用が認められる皮膚外用剤(この態様の本発明皮膚外用剤を、特に、本発明コラーゲン産生促進皮膚外用剤という)、⑤コラーゲンの糖化抑制作用が認められる皮膚外用剤(この態様の本発明皮膚外用剤を、特に、本発明コラーゲン糖化抑制皮膚外用剤という)としての態様を取り得る。

#### 【0011】

【発明の実施の形態】以下、本発明の実施の形態について説明する。

#### A. 本発明皮膚外用剤の有効成分について

本発明皮膚外用剤の有効成分である、コラゲナーゼ分解物の出発原料となる、コラーゲンは、特に限定されず、I型からXIII型のコラーゲンのいずれをも用いることが可能であり、これらの混合物である混合型のコラーゲンを、用いることもできる。現実的には、コラーゲンは、各種の動物や魚類から得られる、混合型のコラーゲンを、用いることが想定されるが、このコラーゲンの出所となる動物(例えば、牛、豚等)や魚類(例えば、ヒラメ、サケ、イワシ、マグロ等)の種類や、コラーゲンの抽出部位も、骨、皮、腱、ウキブクロ(魚類)等が可能である。

【0012】これらの成分からのコラーゲンの抽出・精製は、通常公知の方法を用いて行うことができる。具体的には、例えば、骨、皮、腱、ウキブクロ等のコラーゲンを含有する組織を粉碎した後、水洗、希塩溶液による抽出、酸若しくはアルカリ溶液による抽出、ペプシン、トリプシンやヒアルロニダーゼ等の酵素による抽出して、塩析や透析等の公知の精製手段を施して、コラーゲンを精製して得ることができる。また、通常公知の方法により、「再生コラーゲン」として得ることも可能である。また、市販のコラーゲンを、コラゲナーゼ分解物の出発原料として用いることも可能である。

【0013】そして、ゼラチンは、上述のコラーゲンを、水で加熱抽出して得られる水溶性タンパク質である。本発明においては、通常公知の方法により製造したゼラチンを上記のコラゲナーゼ分解物の出発原料として用いることも可能であり、市販品を用いることも可能である。

【0014】コラゲナーゼ分解物は、上述のようにして得られるコラーゲン又はゼラチンに、コラゲナーゼを作用させて製造することができる(この製造工程、また、得られるコラゲナーゼ分解物自体の内容については、特開平9-176196号公報参照のこと)。

【0015】ここで用いられるコラゲナーゼは、特に限定されないが、*Clostridium histolyticum* *Streptomyces parvulus*等の細菌、放線菌又は真菌等由来で、コラーゲン特有のアミノ酸配列〔(Gly-X-Y) $n$ (式中、Glyはグリシン残基を表し、X、Yは、グリシン残基を除くアミノ酸残基を表し、互いに同一であっても、異なってもよく、 $n$ は、正の整数を表す)：以下、このアミノ酸配列を、「特有アミノ酸配列」ともいう)〕のグリシン残基のアミノ基末端側を、特異的に切断するコラゲナーゼを用いることが、この特有アミノ酸配列のペプチドを豊富に含むコラゲナーゼ分解物を得ることが可能であり、好ましい。

【0016】また、ここで用いるコラゲナーゼは、天然物として得られるコラゲナーゼは勿論のこと、例えば、タンパク工学的な手法で改変して得られる、上記の特異性を有する改変コラゲナーゼであってもよい。

【0017】なお、上記のX、Yが採り得る、グリシン残基を除くアミノ酸残基の種類は、特に限定されず、通常は、天然に存在するアミノ酸(グリシンを除く)のアミノ酸残基、具体的には、アラニン残基、バリン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、プロリン残基、フェニルアラニン残基、トリプトファン残基、メチオニン残基、セリン残基、トレオニン残基、システイン残基、グルタミン残基、アスパラギン残基、チロシン残基、リシン残基、アルギニン残基、ヒスチジン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基のいずれのアミノ酸残基をも採ることができる(本明細書においては、特に断わらない限り、アミノ酸残基は、L型アミノ酸残基を意味する)。

【0018】また、本発明において用いられ得るコラゲナーゼ分解物は、通常公知の方法、例えば、特開平7-82299号公報に記載されている方法に準じて、遊離又はキトパール等の固定化担体に固定化されたコラゲナーゼを、バッチ法、カラム法又はこれらの方法を組み合わせ、好ましくは、反応温度を40~45℃に設定して、製造することができる。

【0019】このようにして製造され得る、特有アミノ酸配列のペプチド、最も好ましくは、上記の正の整数 $n$ が1であるトリペプチドを豊富に含むコラゲナーゼ分解

物（本発明の所期の効果を発揮させるためには、正の整数 $n$ は、可能な限り小さいことが好ましい）は、ゼラチンやコラーゲン特有の抗原性が著しく抑制されており、これを皮膚外用剤に配合することにより、その皮膚外用剤のアレルギー反応等に対する安全性を、さらに向上させることができる。

【0020】なお、特有アミノ酸配列のペプチドを含むコラーゲナーゼ分解物の平均分子量は、280～20000であることが、皮膚における抗老化作用や細胞増殖促進作用を、本発明皮膚外用剤において発現させ得るという点と、コラーゲン等に由来する抗原性を排除し、皮膚に対する安全性をより高度に保つことが可能であるという点において好ましい。この平均分子量の最低値である280は、上述した正の整数 $n$ が1であるトリペプチドを想定した分子量であり、前述したように、可能な限り280付近の小さい値をとることが好ましい。

【0021】さらに、コラーゲナーゼ分解物における、特有アミノ酸配列のトリペプチド（正の整数 $n$ が1である）の含有量は、コラーゲナーゼ分解物に対して30～100重量%であることが好ましく、特に好ましくは同70～100重量%、非常に好ましくは85～100重量%、最も好ましくは95～100重量%である。

【0022】上述した、コラーゲナーゼ分解物の特定の平均分子量の分解物の分取や、特有アミノ酸配列のトリペプチド（正の整数 $n$ が1である）の含有量が特定範囲の分解物の分取は、通常公知の分取法、例えば、ゲル濾過法や逆相クロマトグラフィー法等を、単独で、場合によっては組み合わせて用いることにより行うことができる。

【0023】コラーゲナーゼ分解物は、上述の方法に従い、これを製造して本発明皮膚外用剤に配合することも可能であるが、市販品、例えば、商品名コラーゲン・トリペプチドMシリーズ（宮城化学工業株式会社製）等を用いることも可能である。

【0024】本発明皮膚外用剤におけるコラーゲナーゼ分解物の配合量は、本発明皮膚外用剤の具体的な剤形や用途等に応じて適宜選択することが可能であり、特に限定されるべきものではない。一般的には、剤全体に対して0.00001～20.0重量%であることが好ましく、特に好ましくは同0.0001～10.0重量%、最も好ましくは同0.001～1.0重量%である。

【0025】この配合量が、剤全体に対して0.00001重量%未満であると、皮膚の老化に対する抑制作用や細胞増殖作用を十分に発揮することが困難であり好ましくなく、逆に、同20.0重量%を超えて配合しても、配合量の増加に見合った、前記効果の増強を見込めなくなる傾向が強くなり好ましくないばかりか、製剤においても問題を生じることがある。

【0026】このようにして、コラーゲナーゼ分解物を有効成分とすることにより、①皮膚のしわや、たるみに対

する優れた抑制作用に基づく抗老化効果を発揮する皮膚外用剤、②特に、皮膚のしわの発生の予防やしわの抑制における優れた効果を発揮する皮膚外用剤、③皮膚線維芽細胞の増殖を促進し、真皮の減少を抑制し、皮膚のしわやたるみに優れた効果を発揮する皮膚外用剤、④真皮におけるコラーゲンの産生を促進し、これにより、皮膚のしわやたるみに優れた効果を発揮する皮膚外用剤及び⑤真皮において存在するコラーゲンが糖化により変質して、細胞外マトリックスにおける本来のコラーゲンの作用が衰えることを抑制することにより、皮膚のしわやたるみに優れた効果を発揮する皮膚外用剤（それぞれ、①本発明抗老化用皮膚外用剤、②本発明しわ抑制用皮膚外用剤、③本発明細胞増殖促進皮膚外用剤、④本発明コラーゲン産生促進皮膚外用剤及び⑤本発明コラーゲン糖化抑制剤のことを意味する）が提供される。

【0027】また、コラーゲナーゼ分解物として、特有アミノ酸配列のトリペプチド（正の整数 $n$ が1である）の含有量の多いものを選択することにより、ゼラチンやコラーゲンの抗原性が著しく抑制された、上記の有効性だけではなく安全性にも、特に優れる皮膚外用剤が提供される。

【0028】B. 本発明皮膚外用剤の具体的な態様について

本発明皮膚外用剤は、あらゆる皮膚外用剤（化粧品、医薬品、医薬部外品）としての形態を採ることが可能であり、具体的には、化粧水、乳液、クリーム、軟膏、パック、エアゾル、水-油二層系剤、水-油-粉末三層系剤、美容液、ジェル、ファンデーション、口紅、シャンブー、リンス等に適用することが可能である。また、本発明皮膚外用剤に、皮膚老化に対して有効な公知の成分や、しわの抑制のために有効な公知の成分、さらには公知の美白剤等を、具体的な用途や目的に応じて配合可能である。具体的には、茶エキス、L-リジン、L-アルギニン、カフェイン、タンニン、ペラパミル、トラネキサム酸、トラネキサム酸誘導体、甘草抽出物、グラブリジン、カリンの果実の熱水抽出物、各種の生薬、酢酸トコフェロール、グリチルリチン酸、グリチルリチン酸誘導体、ビタミンC、アスコルビン酸リン酸マグネシウム、アスコルビン酸グルコシド、アルブチン、コウジ酸等の美白剤；グルコース、フルクトース、マンノース、ショ糖、トレハロース等の糖類；レチノイン酸、レチノール、レチノール酢酸、レチノールパルミチン酸等のビタミンA誘導体類等を、上記の有効成分と共に、本発明皮膚外用剤の具体的な態様に応じて配合することが可能である。

【0029】これらの具体的な形態に応じて、種々の基剤成分等、具体的には液体油脂、固体油脂、ロウ類、エステル油、炭化水素油、シリコーン樹脂、シリコーン、陰イオン性界面活性剤、アニオン系界面活性剤、陽イオン性界面活性剤、両性界面活性剤、非イオン性界面活性

剤、低級アルコール、ステロール類、水溶性高分子、金属イオン封鎖剤（エドト酸二ナトリウム、エドト酸三ナトリウム、クエン酸ナトリウム、ポリリン酸ナトリウム、メタリン酸ナトリウム、グルコン酸等）、中和剤、pH調整剤、抗菌剤、香料、色素等を、本発明の所期の効果を損なわない範囲で本発明皮膚外用剤に配合すること可能である。本発明皮膚外用剤の具体的な剤形は、後述する実施例において説明する。

#### 【0030】

【実施例】以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明の技術的範囲が、これにより限定されるものではない。また、本実施例における配合量は、特に断わらない限り、配合成分の配合対象に対する重量%で表示する。

#### 【0031】〔試験例〕

##### 1. 試料の調製

高純度ゼラチン50gを、1000mlの20mM Tris-HCl緩衝液（pH 7.4）/0.1M NaClに加温しながら溶解後、50℃に冷却した。酵素分解用の固定化酵素として、10.0mgのコラゲナーゼ酵素（ワシントン社製、高純度品）を50gのキトパール（富士紡績社製）に2架橋試薬を用いて結合させて調製した。この固定化酵素を、2連式のカラム式バイオリアクターに充填し、20mM Tris-HCl緩衝液（pH 7.4）/0.1M NaClで平衡化を行った。上記工程を経て準備した高純度のゼラチンを、上記工程で調製した、縦型2連式のコラゲナーゼ酵素固定化カラムにアプライし、カラム法による酵素分解を行った。

【0032】最終カラムから出てきた酵素反応終了液を分取し、0.45μmのフィルターでろ過した。このろ液をゲル濾過法、あるいは逆相クロマトグラフィーにより、分画し、それぞれ、平均分子量が20000以上の

もの、Gly-X-Y（Glyは、グリシン残基、X,Yは、アミノ酸残基を表し、X,Yは、同一であっても異なってもよい。以下、同様である）含量が30～85重量%のもの（平均分子量約3000）、Gly-X-Y含量が85～100重量%のもの（平均分子量約300）の調製を行った。分取後、凍結乾燥処理を、それぞれの分取物に施した。

【0033】ここで得られた分取物（後述するコラーゲン由来の分取物を含む）を、以下に述べる試験例ないし実施例において用いた。

【0034】なお、これらの分取物において、公知の手法で、アナフィラキシーテストを行ったところ、いずれの分取物においても、抗原性が極めて低く、これらの分取物は、皮膚における安全性において、非常に優れていることが明らかになった（後述するコラーゲン由来の分取物を含んだ結果である）。

##### 【0035】2. 細胞増殖促進試験

ヒト皮膚線維芽細胞を、10%FBS含有DMEM培地で24時間培養した後、各試料を含んだ0.5%FBS含有DMEM培地に交換して、さらに48時間培養した。培養終了時に、MTT活性を測定し、細胞増殖の指標とした。試料を加えない0.5%FBS含有DMEM培地のみで培養した場合のMTT活性を、100%として表した。試料は、上記の例において調製した、Gly-X-Y含量が30～85重量%の分取物、同85～100重量%の分取物の、2種類について検討した。なお、対照試料としては、上記の例における、平均分子量が20000以上のもの及びEGF（epidermal growthfactor）を用いて、同様の試験を行った。この細胞増殖促進試験の結果を、第1表に示す。

#### 【0036】

##### 【表1】

第 1 表

試 料	MTT活性 (%対対照)		
	濃度0.001%	濃度0.01%	濃度0.1%
ゼラチン分解ペプチド (平均分子量20000 以上)	95%	110%	110%
Gly-X-Y 含量が 30～85重量%の分取物	100%	110%	130%
Gly-X-Y 含量が 85～100 重量%の分取物	110%	120%	150%
EGF	95%	95%	120%

注) MTT活性とは、細胞内のミトコンドリアの呼吸により、色素が還元され着

色される反応を利用した生細胞測定値である。この値が高いほど、細胞増殖活性が認められることを意味する。

【0037】第1表から、Gly-X-Y 含量が30重量%以上の分取物の細胞増殖促進効果は、対照と比べて高いことがわかった。また、Gly-X-Y 含量が85～100重量%であると、より一層、細胞増殖促進活性が向上することが明らかになった。

【0038】なお、前述の例におけるゼラチンの代わりに、市販のコラーゲンを、同例において用いたコラゲナーゼ酵素で酵素分解した後、これを、上記と同様の処理を行って、Gly-X-Y 含量が30～85重量%の分取物（平均分子量約3000）及び同85～100重量%の分取物（平均分子量約300）の調製を行い、上記と同様の細胞増殖促進試験を行った。その結果、これらのコラーゲン由来の分取物は、両者共、対照よりも優れた細胞増殖促進活性を有していた。また、また、Gly-X-Y 含量が85～100重量%であると、より一層、細胞増殖促進活性が向上することも、前述のゼラチンに由来する分取物についての結果と同様であった。

【0039】この結果により、本発明皮膚外用剤の有効成分であるコラゲナーゼ分解物は、優れた細胞増殖促進作用を有し、これにより、真皮の減少を抑制し、皮膚のしわやたるみに対して優れた効果を発揮し得ることが明らかになった。

【0040】3. コラーゲン産生促進試験

ヒト皮膚線維芽細胞を、10%FBS含有DMEM培地で48時間培養した後、各試料を含んだ0.5%FBS含有DMEM培地に交換して、さらに4.8時間培養した。培養終了後に、I型コラーゲン生合成能を測定するために培養上清を、細胞量を計測するために細胞を採取した。試料は、上記の例において調製した、Gly-X-Y 含量が30～85重量%の分取物、同85～100重量%の分取物の、2種類について検討した。なお、対照試料としては、優れたコラーゲン産生促進作用が知られているビタミンCを用いて、同様の試験を行った。細胞のI型コラーゲン生合成能は、培養上清中に分泌されるI型プロコラーゲンのC末端ペプチド（Procollagen type I C-peptide: PIPと略す。）量を測定することにより評価した。具体的には、「Procollagen type IC-peptide (PIP) 測定キット（宝酒造株式会社：MK001）」を用いて測定した。細胞量は細胞のDNA量で推定することとし、DNA量は、Cesar Lsbarca らの方法（Analytical Biochemistry、102、344-352、(1980)）に準じてHoechst 33258 試薬を用いて測定した。このコラーゲン産生試験の結果を第2表に示す。

【0041】

【表2】

第 2 表

試 料	PIP 量 (%対照)		
	濃度0.0001%	濃度0.001%	濃度0.01%
ゼラチン分解ペプチド (平均分子量20000 以上)	95%	98%	110%
Gly-X-Y 含量が 30～85重量%の分取物	118%	126%	165%
Gly-X-Y 含量が 85～100 重量%の分取物	120%	160%	185%
ビタミンC (濃度0.2mM)		178%	

【0042】第2表から、Gly-X-Y 含量が30重量%以上の分取物は、コラーゲン産生促進効果に優れることが明らかになった。また、Gly-X-Y 含量が85～100重量%であると、より一層、コラーゲン産生促進活性が向上することが明らかになった。

【0043】この結果により、本発明皮膚外用剤の有効成分であるコラゲナーゼ分解物は、優れたコラーゲン産生促進作用を有し、これにより、皮膚のしわやたるみに

対して優れた効果を発揮し得ることが明らかになった。

【0044】4. コラーゲン糖化抑制試験

ヒト皮膚線維芽細胞によるコラーゲンゲル収縮活性を指標とした糖化反応による架橋形成の阻害作用を評価した。コラーゲン溶液（コラーゲンは高研株式会社製品I-A Cを使用した。）を氷上に作製後、細胞培養用12穴ウェルプレート（コーニング：25815）に加え、37℃でコラーゲンをゲル化した。被験物質（コン

コントロールとしては1, 3-ブチレンジグリコールを用いた。また、優れたコラーゲンの糖化抑制活性が認められているL-リジンとL-アルギニンについても検討を行った。濃度は重量%) 含有グルコース-6-リン酸溶液(最終濃度; 100mM)を添加後、37℃にて7日間インキュベートすることにより糖化反応(グリケーション)を行った。

【0045】未反応のグルコース-6-リン酸を洗浄により除去後、 $1 \times 10^5$  cells / mlの線維芽細胞をコラーゲンゲル上に植えつけ、0.25%FBS/DMEM

培地を上載した。3時間後、シャーレ壁面からゲルを剥離し、コラーゲン収縮を行った。48時間後、培地を吸引して、コラーゲンゲルの直径を測定し、面積を算出した。その結果を第3表に示す。なお、収縮後のコラーゲン面積は、小さい方が、コラーゲン架橋が正常に保たれており、糖化反応によりコラーゲンが変性を受けていないことを意味する。

【0046】

【表3】

第 3 表

グリケーション	被検物質	収縮後のコラーゲン面積 (cm <sup>2</sup> )
なし	コントロール	247.8
あり	コントロール	379.9
あり	Gly-X-Y 含量が 30 ~85 重量%の分取物 (0.05%)	290.2
あり	Gly-X-Y 含量が85~100 重量%の分取物 (0.05%)	268.5
あり	L-リジン (0.5 %)	243.0
あり	L-アルギニン (0.5 %)	241.2

【0047】第3表から、Gly-X-Y 含量が30重量%以上の分取物には、優れたコラーゲンの糖化抑制作用が認められることが明らかになった。また、Gly-X-Y 含量が8.5~100重量%であると、より一層、コラーゲンの糖化抑制作用に一層優れることが明らかになった。

【0048】この結果により、本発明皮膚外用剤の有効成分であるコラゲナーゼ分解物は、優れたコラーゲン糖化抑制作用を有し、これにより、皮膚のしわやたるみに対して優れた効果を発揮し得ることが明らかになった。このように、コラゲナーゼ分解物には、特に、真皮層における主要な線維構造を構成するコラーゲンを、量的(コラーゲンの産生促進活性)・質的(コラーゲンの糖化による変性抑制作用)に維持・増強し得る作用が認められ、皮膚外用剤の有効成分として用いることにより、皮膚構造にかかわる老化現象(典型的には、しわやたるみ)の予防・改善に有効であることが明らかになった。

【0049】5. 皮膚老化改善効果試験  
後述する実施例1ないし比較例1(実施例1の処方におけるGly-X-Y 含量が30~85重量%の分取物を、イオン交換水と置換して調製したもの)に示す化粧品(クリーム)について、以下に示す実使用試験を行った。

【0050】試験方法  
無作為に抽出した、年齢25~60歳の健常人(女性)100名を被験者とし、試験品を、顔面の皮膚に、連日

1ヵ月間使用した後、シワに対する改善効果と、たるみに対する改善効果について検討した。

【0051】a) しわに対する効果の評価: 目尻の状態を、目視により観察し、以下の評価基準に基づいて評価した。

【0052】評価基準

- A: 非常に改善された
- B: 改善された
- C: やや改善された
- D: 改善効果が認められない
- E: 悪化した

b) たるみに対する効果

顔全体の皮膚の状態を、目視により観察し、以下の評価基準に基づいて評価した。

【0053】評価基準

- A: 非常に改善された
- B: 改善された
- C: やや改善された
- D: 改善効果が認められない
- E: 悪化した

これらの実使用試験の結果を、第4表に示す。

【0054】

【表4】

第 4 表

しわに対する効果 (人)      たるみに対する効果 (人)



	A	B	C	D	E		A	B	C	D	E
実施例 1	19	32	38	11	0		22	28	32	18	0
比較例 1	6	21	45	26	2		0	23	58	19	0

【0055】第4表から、実施例1の本発明品であるクリームを用いた場合には、比較例1のクリームを用いた場合よりも、目尻のしわにおいても、皮膚のたるみにおいても、明らかに改善されていることが認められる。このことにより、上述の分取物を有効成分として配合した皮膚外用剤は、皮膚において、抗老化効果、しわ抑制効果等をもたらす外用剤であることが明らかになった。

〔実施例1〕 クリーム

配合成分

ステアリン酸	
ステアリルアルコール	
イソプロピルミリステート	
グリセリンモノステアリン酸エステル	
プロピレングリコール	
Gly-X-Y 含量が30～85重量%の分取物（ゼラチン由来）	
KOH	
亜硫酸水素ナトリウム	
防腐剤	
香料	
イオン交換水	

配合量（重量%）

5.0
4.0
18.0
3.0
10.0
0.01
0.2
0.01
適量
適量
残余

＜製法＞イオン交換水に、プロピレングリコールと、分取物及びKOHを加えて、溶解後、加熱し、70℃に保った（水相）。この水相に、他の成分を加熱融解して70℃に保った油相を、徐々に添加し、全部加え終わって

【0056】以下、上述の実施例1を含めて、種々の剤形の本発明皮膚外用剤の処方例を実施例として記載する。なお、実施例1以外の実施例についても、上述の実使用試験を行ったところ、いずれの実施例においても、非常に優れた皮膚の抗老化効果やしわ抑制効果が認められた。

【0057】

から、しばらくその温度に保ち、反応させた。その後、ホモミキサーで均一に乳化し、よく攪拌しながら、30℃まで冷却して、クリームを得た。

【0058】

〔実施例2〕 クリーム

配合成分

ステアリン酸	
ステアリルアルコール	
水添ラノリン	
スクワラン	
2-オクチルドデシルアルコール	
ポリオキシエチレン（25モル）	
セチルアルコールエーテル	
グリセリンモノステアリン酸エステル	
プロピレングリコール	
Gly-X-Y 含量が85～100重量%の分取物（ゼラチン由来）	
亜硫酸水素ナトリウム	
エチルパラベン	
香料	
イオン交換水	

配合量（重量%）

2.0
7.0
2.0
5.0
6.0
3.0
2.0
5.0
0.05
0.03
0.3
適量
残余

＜製法＞イオン交換水に、プロピレングリコールを加え、加熱して70℃に保った（水相）。この水相に、他の成分を加熱融解して70℃に保った油相を添加し、予

備乳化を行い、ホモミキサーで均一に乳化した後、よく攪拌しながら30℃まで冷却して、クリームを得た。

【0059】

〔実施例3〕 クリーム

配合成分

配合量（重量%）

固形パラフィン	5. 0
ミツロウ	10. 0
ワセリン	15. 0
流動パラフィン	41. 0
グリセリンモノステアリン酸エステル	2. 0
ポリオキシエチレン (20モル)	
ソルビタンモノラウリン酸エステル	2. 0
石けん粉末	0. 1
硼砂	0. 2
Gly-X-Y 含量が30~85重量%の分取物 (コラーゲン由来)	0. 5
ワレモコウエタノール抽出物	0. 05
亜硫酸水素ナトリウム	0. 03
エチルパラベン	0. 3
香料	適 量
イオン交換水	残 余

<製法>イオン交換水に、石けん粉末と硼砂を加え、加熱溶解して70℃に保った(水相)。この水相に、他の成分を加熱融解して70℃に保った油相を、徐々に添加し、反応させた。反応終了後、ホモミキサーで均一に乳

化し、乳化後、よく攪拌しながら、30℃まで冷却して、クリームを得た。

【0060】

〔実施例4〕 乳液

配合成分	配合量 (重量%)
ステアリン酸	2. 5
セチルアルコール	1. 5
ワセリン	5. 0
流動パラフィン	10. 0
ポリオキシエチレン (10モル)	
モノオレイン酸エステル	2. 0
ポリエチレングリコール1500	3. 0
トリエタノールアミン	1. 0
カルボキシビニルポリマー	0. 05
(商品名: カーボポール941, B.F.Goodrich Chemical company)	
Gly-X-Y 含量が85~100 重量%の分取物 (コラーゲン由来)	10. 0
亜硫酸水素ナトリウム	0. 01
エチルパラベン	0. 3
香料	適 量
イオン交換水	残 余

<製法>イオン交換水に、プロピレングリコールを加え、加熱して70℃に保った(水相)。この水相に、他の成分を加熱融解して70℃に保った油相を、徐々に添

加し、ホモミキサーで均一に乳化し、乳化後、よく攪拌しながら、30℃まで冷却して、乳液を得た。

【0061】

〔実施例5〕 ゼリー

配合成分	配合量 (重量%)
95%エチルアルコール	10. 0
ジプロピレングリコール	15. 0
ポリオキシエチレン (50モル)	
オレイルアルコールエーテル	2. 0
カルボキシビニルポリマー	1. 0
(商品名: カーボポール940, B.F.Goodrich Chemical company)	
NaOH	0. 15
L-アルギニン	0. 1
Gly-X-Y 含量が30~85重量%の分取物 (ゼラチン由来)	0. 0001

2-ヒドロキシ-4-メトキシベンゾフェノン	
スルホン酸ナトリウム	0.05
エチレンジアミンテトラアセテート・	
3ナトリウム・2水	0.05
メチルパラベン	0.2
香料	適量
イオン交換水	残余

＜製法＞イオン交換水に、カルボキシビニルポリマーを均一に溶解し（水相）、これとは別に、95%エチルアルコールに、ポリオキシエチレン（50モル）オレイルアルコールエーテルを溶解し、これを水相に添加した。次いで、これに、その他の成分を加えた後、NaOHとL-アルギニンで中和させ、増粘し、ゼリーを得た。  
【0062】

〔実施例6〕 美容液

配合成分	配合量（重量%）
(A相)	
95%エチルアルコール	10.0
ポリオキシエチレン（20モル）	
オクチルドデカノール	1.0
パントテニールエチルエーテル	0.1
Gly-X-Y 含量が85~100重量%の分取物（ゼラチン由来）	1.5
メチルパラベン	0.15
(B相)	
KOH	0.1
(C相)	
グリセリン	5.0
ジプロピレングリコール	10.0
亜硫酸水素ナトリウム	0.03
カルボキシビニルポリマー	0.2
（商品名：カーボポール940, B.F.Goodrich Chemical company）	
イオン交換水	残余

＜製法＞A相、C相を、それぞれに均一に溶解し、C相にA相を加えて可溶化した。次いで、B相を加えた後、充填を行い、美容液を得た。  
【0063】

〔実施例7〕 パック

配合成分	配合量（重量%）
(A相)	
ジプロピレングリコール	5.0
ポリオキシエチレン（60モル）硬化ヒマシ油	5.0
(B相)	
Gly-X-Y 含量が30~85重量%の分取物（コラーゲン由来）	0.01
オリーブ油	5.0
酢酸トコフェロール	0.2
エチルパラベン	0.2
香料	0.2
(C相)	
亜硫酸水素ナトリウム	0.03
ポリビニルアルコール	13.0
（ケン化度90，重合度2000）	
エタノール	7.0
イオン交換水	残余

＜製法＞A相、B相及びC相を、それぞれ均一に溶解し、A相をB相に加えて可溶化した。次いで、これをC相に加えた後、充填を行い、パックを得た。  
【0064】

〔実施例 8〕 固形ファンデーション

配合成分	配合量 (重量%)
タルク	43.1
カオリン	15.0
セリサイト	10.0
亜鉛華	7.0
二酸化チタン	3.8
黄色酸化鉄	2.9
黒色酸化鉄	0.2
スクワラン	8.0
イソステアリン酸	4.0
モノオレイン酸 P O E ソルピタン	3.0
オクタン酸イソセチル	2.0
Gly-X-Y 含量が85~100 重量%の分取物 (コラーゲン由来)	1.0
防腐剤	適 量
香料	適 量

＜製法＞タルク～黒色酸化鉄の粉末成分を、ブレンダーで十分混合し、これにスクワラン～オクタン酸イソセチルの油性成分、分取物、防腐剤、香料を加え、良く混練

した後、容器に充填して成型し、固形ファンデーションを得た。

【0065】

〔実施例 9〕 乳化型ファンデーション (クリームタイプ)

配合成分	配合量 (重量%)
(粉体部)	
二酸化チタン	10.3
セリサイト	5.4
カオリン	3.0
黄色酸化鉄	0.8
ベンガラ	0.3
黒色酸化鉄	0.2
(油相)	
デカメチルシクロペンタシロキサン	11.5
流動パラフィン	4.5
ポリオキシエチレン変性ジメチルポリシロキサン	4.0
(水相)	
イオン交換水	50.0
1, 3-ブチレングリコール	4.5
Gly-X-Y 含量が30~85重量%の分取物 (ゼラチン由来)	1.5
ソルピタンセスキオレイン酸エステル	3.0
防腐剤	適 量
香料	適 量

＜製法＞水相成分を加熱攪拌後、これに、十分混合粉碎した粉体部を添加して、ホモミキサー処理を行った。更に、加熱混合した油相を加えて、ホモミキサー処理した後、攪拌しながら香料を添加して、室温まで冷却して、乳化型ファンデーションを得た。

【0066】

【発明の効果】本発明により、皮膚の抗老化効果、しわ抑制効果、さらには、細胞増殖促進作用、コラーゲン産生促進作用、コラーゲン糖化抑制作用が認められ、しかも、安全性に極めて優れる皮膚外用剤が提供される。

フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>

A 6 1 P 43/00

識別記号

1 0 7

F I

A 6 1 K 37/18

テーマコード (参考)